

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 4 月 4 日 (04.04.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/26977 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, 5/08, 5/10, A61K 35/12, 35/30, 48/00, 31/711, A61P 25/16, 21/04, 25/14, 25/28, 9/10, 25/00, 35/00

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06668

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) 国際出願日: 2000 年 9 月 27 日 (27.09.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社フレテック (FRETEK, CO., LTD.) [JP/JP]; 〒102-0083 東京都千代田区麹町5-7 秀和紀尾井町TBRビル1211号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 菅野 洋 (KANNO, Hiroshi) [JP/JP]; 〒232-0072 神奈川県横浜市区永田東2-7-8 Kanagawa (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: HOST CELL OBTAINED BY TRANSFERRING VHL GENE INTO CANCER CELL OR EMBRYONIC STEM CELL AND EXPRESSING

(54) 発明の名称: ガン細胞または胚性幹細胞にVHL遺伝子を導入し、発現して得られる宿主細胞

(57) Abstract: A host capable of serving as a nerve cell which is constructed by transferring von Hippel-Lindau gene into a cancer cell such as a neuroblastoma cell or an undifferentiated tumor cell originating in the nervous system or an embryonic stem cell and expressing therein. The obtained host is proliferated *in vitro* and then transplanted into the central nervous system or peripheral nerve. After taking, it is allowed to function as a nerve cell to thereby treat intractable nerve diseases concerning function injury such as Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's chorea, Alzheimer's disease, brain infarction, spinal cord injury, cerebral contusion, malignant tumor, etc.

(57) 要約:

神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞等のガン細胞または胚性幹細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子を導入し、発現させることにより作成した、神経細胞として機能しうる宿主。得られた宿主をイン・ビトロで増殖後、中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着させ、神経細胞として機能させることにより、障害のある神経機能に関連したパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン舞踏病、アルツハイマー病、脳梗塞、脊髄損傷、脳挫傷または悪性腫瘍などの神経難病を治療する。

WO 02/26977 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

ガン細胞または胚性幹細胞にVHL遺伝子を導入し、発現して得られる宿主細胞

技術分野

本発明は、神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞等のガン細胞または胚性幹細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子 (von Hippel-Lindau、VHL 遺伝子) を導入し、発現させて得られる、神経細胞として機能しうる宿主細胞に関し、より詳細には、中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着させ、神経細胞として機能させることにより、障害された神経機能に関連した疾患の患者を治療するための上記宿主細胞に関する。

背景技術

神経細胞 (ニューロン) は、高等生物個体の生命活動を統御する主要素であり、従来は、中枢神経系の神経細胞は生後一切分裂せず、刻々と脱落してゆくのみで決して再生することはないとされてきた。ところが、1990 年代になって、まず胎児脳において神経細胞へ分化する前の神経幹細胞が発見され、更に、成人の脳においても神経幹細胞の存在が証明されてから、中枢神経が再生する可能性が示唆され、神経幹細胞を用いた神経難病に対する治療や更にあらゆる細胞へ分化することが可能で万能細胞とも呼ばれている胚性幹細胞 (ES 細胞 (embryonic stem cell)) を用いた治療の可能性が脚光を浴びて始めている。

しかしながら、ヒトの神経幹細胞は妊娠中絶したヒトの胎児の脳のみからしか採取できないため、倫理的な問題を克服しなければならないだけでなく、また採取量に限界があるため、神経疾患への治療のための使用量を確保するのが困難である。また、苦労して集めた神経幹細胞も一部しか神経細胞 (ニューロン) へ分化せず、大部分は神経膠細胞 (グリア) へ分化してしまうという問題がある。

この問題に関して、本発明者は、VHL 遺伝子およびVHL 遺伝子産物が中枢神経系の神経細胞に特異的に発現しているということから、神経細胞の発生の段階から何らかの役割を担っていると考え、神経幹細胞におけるVHL 遺伝子産物の発現を検討

したところ、VHL 遺伝子産物は神経幹細胞が神経細胞へ分化するのに伴い主に細胞質に発現すること、更にVHL 遺伝子を単純ヘルペスウイルスベクターを用いて神経幹細胞へ導入したところ神経細胞への分化が促進されたことが明らかとなり、神経幹細胞においてはVHL 遺伝子は神経分化誘導に関与する遺伝子であることが分かった (Kanno H: Cancer Res 2820-4, 2000)。しかしながら、もともと神経幹細胞は、神経細胞（ニューロン）または神経膠細胞（グリア）のいずれかに分化する細胞であり、また塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) を培地中に添加しても同様な現象がみられることから、VHL 遺伝子そのものに直接的な神経への分化誘導能があるかどうかは明らかではない。

これに対し、不死化した癌細胞またはES細胞は、神経幹細胞と異なって試験管内で無限に培養可能であるが、それらの分化のメカニズムは不明であり、どのような遺伝子を操作したらどのように分化して再生医療へ使用できるようになるかについてはほとんど分かっていない。ましてや、神経幹細胞に比べて神経細胞へ分化誘導することがはるかに困難な不死化した癌細胞やES細胞に単に特定の遺伝子を導入するだけで直接、神経細胞へ分化誘導することについては誰も成功していなかった。ただ、癌細胞の中でも小児癌の一種で副腎の神経細胞から発生した神経芽腫より樹立された神経芽腫細胞はレチノイン酸を培地中に添加すると神経細胞様の突起を伸ばすことが知られていたが、電気信号を伝える機能を有する本当の神経細胞にまでは分化しない。培養しているES細胞を、神経幹細胞を経て神経細胞へ分化させる方法に関しては、レチノイン酸を培地中に添加したり (Fraichard A, et al: J Cell Sci 108: 3181-8, 1995)、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を添加してやや高率に神経細胞へ分化させる方法 (Okabe S, et al: Mech Dev 59: 89-102, 1996) が知られているが、すべての細胞を神経細胞へ分化させることができるわけではなく、さらに神経幹細胞や神経細胞を選別する必要が生じる。また、このような方法でES細胞から神経細胞まで分化誘導するには、6日間以上の日数を要するとされている。

神経細胞への分化誘導とは逆に、分化を制御することも重要な技術であるが、これについては癌抑制遺伝子の一部がその様な機能を有するとの報告がなされている。しかしながら、神経分化を誘導する遺伝子の逆配列（アンチセンス）で神経分化を制御したのは、本発明者等がVHL 遺伝子のアンチセンスで神経幹細胞から神経細胞への

分化の制御を報告しているが (Kanno H, et al: Cancer Res 60: 2820-2824, 2000)、癌細胞あるいはES細胞からの分化制御は報告されていない。

米国では、既に中絶した胎児脳をパーキンソン病の治療に用いる臨床試験が行われ、一定の効果が認められている。そして、動物実験レベルでは、神経幹細胞やES細胞を脳や脊髄に移植し、そこで神経細胞へ分化させることで、パーキンソン病だけでなく、脳梗塞、脊髄損傷などの難治性の神経疾患の治療を行う試みが行われ始めている。また、末梢神経の再生を試験管内あるいは生体内で神経線維の束の形にして再生する試みは以前からなされている。ところが、神経細胞は原則として分裂・増殖しないため、実用的な神経の束に作ることは困難である。末梢神経の断裂に対する神経移植においては通常は下肢の自家神経を切除してそれを移植する治療法がなされているが、神経移植のための自家神経にかわる人造の神経の製造には成功していない。

発明の開示

本発明の目的は、ガン細胞または胚性幹細胞にVHL遺伝子を導入し、発現して得られ、神経細胞として機能する宿主細胞を提供することにある。本発明の別の目的は、障害のある神経機能に関連した疾患の患者を治療するための神経細胞を神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞等のガン細胞または胚性幹細胞から得る方法を提供することにある。本発明の更なる目的は、アンチセンス技術による癌細胞あるいはES細胞からの神経細胞への分化を抑制する方法を提供することにある。

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意検討を行った結果、VHL遺伝子を神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞等のガン細胞に導入することにより神経細胞へ分化できることならびに胚性幹細胞にVHL遺伝子を導入すると神経幹細胞を経て神経細胞へ分化することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

- (1) ガン細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子を導入し、発現させて得られる宿主細胞。
- (2) ガン細胞が神経芽腫細胞である1項記載の宿主細胞。
- (3) ガン細胞が神経系由来の未分化腫瘍細胞である1項記載の宿主細胞。

(4) 以下の性質を有する 1 項記載の宿主細胞。

(イ) 神経細胞特異的タンパク質として神経ペプチド Y および神経フィラメントを発現し、神経ペプチド Y を細胞外へ分泌する。

(ロ) 神経細胞特有の瘤を持つ神経突起を出し、神経回路を形成できる。

(ハ) 神経細胞特有の膜電位を有し、電気信号を伝達できる。

(ニ) 試験管内で培養、増殖後、中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着する。

(5) 胚性幹細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子を導入し、発現させることにより作成した宿主細胞。

(6) 以下の性質を有する 5 項記載の宿主細胞。

(イ) 神経細胞特異的タンパク質として神経ペプチド Y、神経フィラメントおよび微小管関連タンパク質 2 (MAP 2) を発現する。

(ロ) 神経として電気信号を伝達し、神経経路を形成できる成熟した神経細胞である。

(ハ) 機能性を有する神経として活動電位を伝播し、神経回路を形成できる。

(ニ) 試験管内で培養、増殖後、中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着する。

(7) 中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着させ、神経細胞として機能させることにより、障害された神経機能に関連した疾患の患者を治療するための 1 項または 5 項記載の宿主細胞。

(8) 疾患がパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン舞踏病、アルツハイマー病、脳梗塞、脊髄損傷、脳挫傷または悪性腫瘍である 7 項記載の宿主細胞。

(9) ガン細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子を導入して、神経分化を誘導し神経細胞を得る方法。

(10) ガン細胞が神経芽腫細胞である 9 項記載の方法。

(11) ガン細胞が神経系由来の未分化腫瘍細胞である 9 項記載の方法。

(12) 胚性幹細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子を導入して、神経幹細胞を経て、神経分化を誘導し、神経細胞を得る方法。

(13) ガン細胞または胚性幹細胞にアンチセンス RNA またはアンチセンス DNA

を導入して、フォン・ヒッペル・リンドー遺伝子の発現を抑制し、神経幹細胞から神経細胞への分化を抑制する方法。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

脳腫瘍（血管芽腫）や腎癌を生じる遺伝性疾患のフォン・ヒッペル・リンドー（von Hippel-Lindau）病の原因遺伝子である VHL 遺伝子は、一種の腫瘍抑制遺伝子である。この遺伝子は 1993 年に米国のツバー（Zbar）博士らのグループによりヒトの第 3 番染色体より単離された。この遺伝子および蛋白は神経細胞（ニューロン）に発現していることは報告されていたが、この遺伝子の神経系に関する機能については不明であった。そこで、本発明者等は、この遺伝子は胎児の発生段階で神経系が形成される時に関わっている可能性があるのではないかと考え、ラットの胎児脳から分離した神経幹細胞の分化を経時的に検討したところ、神経幹細胞が神経細胞への分化をするに伴い、VHL 蛋白が神経細胞に発現することを見出した。

すなわち、本発明は、（イ）小児癌の一種で副腎の神経細胞から発生したヒト神経芽腫の不死化した細胞に VHL 遺伝子を導入し発現させることで、電気信号を伝導する神経本来の機能を有し、神経回路（ネットワーク）を形成することのできる増殖性の神経細胞（ニューロン）へ直接的かつ迅速に分化誘導できること、（ロ）高等生物個体を構成するあるゆる細胞へ分化する可能性を有し万能細胞とも呼ばれる ES 細胞に VHL 遺伝子を導入し発現させることで、短期間で確実に神経幹細胞から神経細胞へ分化誘導できること、という知見に基づくものである。

ヒト神経芽腫細胞に VHL 遺伝子を導入し発現させることにより作成した宿主細胞は、以下の性状を有する。

（イ）神経細胞特異的蛋白を発現し、その一部を分泌する。（ロ）神経細胞特有の瘤（varicosity）を持つ神経突起を出し、神経回路（ニューロネットワーク）を形成できる。（ハ）神経細胞特有の膜電位が測定でき、電気信号を伝達できる。（二）試験管内で培養・増殖後、中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着する。

また、ES 細胞に VHL 遺伝子を導入し発現した宿主細胞は以下の性状を有する。

（イ）神経として電気信号を伝達し、神経回路（ニューロネットワーク）を形成しう

る成熟した神経細胞である。(ロ) 試験管内で大量に増殖・培養し、中枢神経系内および末梢神経へ移植可能である。(ハ) 生体内へ移植され、生着した細胞は神経細胞として機能し、障害された神経機能を回復する可能性を有する。

上記した、VHL 遺伝子は神経幹細胞において神経分化誘導能を有するという結果から、VHL 遺伝子はその他の神経系の細胞においても神経分化を誘導するのではないかと考え、小児癌の一種で副腎の神経細胞から発生したヒト神経芽細胞腫の不死化した細胞に VHL 遺伝子を組み込んだプラスミドの発現ベクターを用いて VHL 遺伝子を導入し、常に VHL 遺伝子が強発現している神経芽細胞腫を作成した。そして、その作成した細胞の性質を調べたところ、細胞の形態が神経細胞特有に変化し、神経細胞でしか認められない物質の遺伝子と蛋白の発現を認め、さらに神経細胞でしか認められない細胞膜の微小電位を確認した。これらの結果から、VHL 遺伝子を導入した神経芽細胞腫は神経細胞に極めて近い細胞へ変化したことが明らかとなり、この人為的に作成した細胞あるいは VHL 遺伝子を導入して神経細胞へ分化させた神経幹細胞を移植することにより、神経細胞が破壊される病気（パーキンソン病、アルツハイマー病、脊髄損傷、脳梗塞など）の治療が可能であるとの知見を得た。

また、神経幹細胞から神経細胞の分化を制御するために、VHL 遺伝子のメッセンジャー RNA に対するアンチセンス・オリゴヌクレオチドを設計して用いると、神経分化が抑制された。さらに、本発明者等は、ウイルスベクターを用いて VHL 遺伝子を導入することにより神経幹細胞から神経細胞へ分化（転換）させることに成功した。これらのことから、VHL 遺伝子は神経幹細胞から神経細胞への分化を誘導していることが明らかとなった (Kanno H, et al.: Cancer Research 60:2840-2824, 2000)。これまでにこうした能力を有する遺伝子は報告されていない。

同様な方法で、すべての細胞の元になる胚性幹細胞に VHL 遺伝子を導入したところ、大部分の細胞が神経幹細胞を経て神経細胞へ分化することが明らかになった。この方法によって作成した神経細胞を移植することで、上記神経が破壊された疾患（神経難病）の治療に応用可能である。

宿主細胞へ導入する VHL 遺伝子として用いた VHLcDNA (g7-11) は、以下のような方法によって得ることができる。まず、正常脳または腎組織を、グアニジンイソチオシアネートを含んだフェノール又はフェノール/クロロホルム溶液でホモジナイズし、

高速遠心により水層と有機層に分離した後、水層に含まれる全RNAをイソプロパノールに加え沈殿させて回収する。次に、mRNA から逆転写酵素の存在下に cDNA を合成したのち、5'-CTGAATTCACCATGCCCCGAGGGCGGAG-3'（配列番号1）および5'-GAGAATTCTCAATCTCCCATCCGTTGATG-3'（配列番号2）をプライマーのセットとして用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法によりサーマルサイクラーを用いて目的の領域を増幅し、精製したのち、ベクターに組み込む。

このようなベクターとしては、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルスベクターを用いることができる。ベクターに上記VHL遺伝子を挿入するには、まず、精製された上記VHL遺伝子を含むDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNA の制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

上記VHL遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、VHL遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、イントロンの5'末端側に存在するスプライス供与部位およびイントロンの3'末端側に存在するスプライス受容部位からなるスプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）などを含有するものを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

プロモーターとしてSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、37℃で行う。なお、培地のpHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。

形質転換体を培養する培地として、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1～30日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

具体的には、上記VHL遺伝子は、ネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれたプラスミド発現ベクター (pcDNA3.1, Invitrogen 社; 同ベクターは、CMVプロモータ、SV40複製起点、ネオマイシン耐性遺伝子、ColE1、アンピシリン耐性遺伝子等を含む。)へ組み込む。

VHL遺伝子を組み込んだプラスミド発現ベクターpcDNA3.1を、ネオマイシン (Genecitin, GIBCO BRL) 濃度が200 µg/mLになるようにした10%牛胎児血清を含むDMEMまたはDMEM/F12培地で培養中の神経芽腫細胞 (SH-SY5Y)へ遺伝子導入試薬 (Effectene (商標) トランスフェクション試薬 (QIAGEN 社))を用いて導入して、発現しているクローンのみを選別し、増殖させる。この際、導入するために用いる細胞はSH-SY5Y以外の神経芽腫細胞であってもよい。また、ベクターもプラスミド発現ベクターでなくとも他の発現ベクターでもよい。

VHL遺伝子を導入する前の神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) 等のガン細胞は、10%牛胎児血清を含むDMEM培地で、炭酸ガス培養装置内で37℃、5%二酸化炭素の条件でペトリ・ディッシュ3003 (ファルコン社)にてディッシュ底に接着させて培養する。継代培養は、4日毎に1:6に分割して行う。

VHL遺伝子導入後の神経芽腫細胞 (SH-SY5Y)は、ネオマイシン (Genecitin, GIBCO BRL) を200 µg/mLの濃度になるように調整した10%牛胎児血清を含むDMEMまたはDMEM/F12培地で、炭酸ガス培養装置内で37℃、5%二酸化炭素の条件でペトリ・ディッシュ3003 (ファルコン社)にてディッシュ底に接着させて培養可能である。この細胞の継代培養は、6日毎に1:6に分割して行う。

VHL遺伝子を導入前のES細胞の培養は、Bainらの方法 (Bain G, et al: Developmental Biology 168: 342-357, 1995)に従って行う。

VHL遺伝子を導入したガン細胞 (神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞) およびES細胞 (宿主細胞) におけるVHL蛋白および神経特異蛋白の発現は、以下の方法によって調べる。神経特異的蛋白質として、NPY、NFH、MAPsを調べる。この方法は、Kannoらの論文 (Kanno H, et al.: Cancer Res 60: 2820-2824, 2000)に記載された方法に準じて、蛍光免疫染色法にて行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察

する。VHL蛋白と神経特異的蛋白が同時に同じ細胞に発現している。

VHL遺伝子を導入したガン細胞（神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞）およびE S細胞（宿主細胞）からの神経特異的蛋白の分泌は、別の Kanno らの論文（KannoH, et al.: Cancer GeneTherapy 6 (2) : 147-154, 1999）に記載された方法に準じてELISA 法にて行う。宿主細胞においてはカリウムイオンによる細胞外電位刺激およびカルバコールによるコリン刺激により、NPY の開口放出が観察される。

VHL遺伝子を導入したガン細胞（神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞）およびE S細胞（宿主細胞）の形態は、位相差顕微鏡によって観察する。成熟した神経細胞へ分化している場合は、細胞突起に瘤（varicosity）が観察される。

神経電気生理学的所見は、以下の方法によって調べる。すなわち、パッチクランプ法により、微小針電極を細胞に刺して、細胞内電位を測定すると、神経細胞（ニューロン）にみられる大きなナトリウムチャンネル電流とカリウムチャンネル電流が測定される。

VHL遺伝子導入ガン細胞（神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞）およびE S細胞（宿主細胞）の移植は、以下の方法によって行う。すなわち、あらかじめ宿主細胞を十分に無血清のDMEMなどの培地で洗浄したのちに、0.1mL の生理食塩水中に10万個以上の濃度で細胞を含むように調整し、大脳への移植の場合は、10万個～1000万個の細胞を、定位的脳手術装置を用いて脳内の目的の部位へ、あるいは既に脳に埋め込んである注入装置（オンマヤリザボアなど）を用い、あるいは脊髄注入針を用いて腰椎部から髄液腔内へ注入する方法にて行う。

本発明は、VHLをコードする核酸を標的とし、かつVHL発現を阻害可能なオリゴヌクレオチドを提供する。

本発明の好適なオリゴヌクレオチドはキメラオリゴヌクレオチドである。キメラオリゴヌクレオチドは、少なくとも一つのヌクレオチドから構築される、2以上の化学的に異なる領域を含むオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、1以上の有利な性質（例えば、ヌクレアーゼ耐性、細胞内への取り込みおよびRNA標的に対する結合親和性の増加）を与える少なくとも一つの修飾されたヌクレオチド領域およびRNaseH切断のための基質である領域を含む。1つの好適な実施態様において、キメラオリゴヌクレオチドは、標的結合親和性を増加させるために修飾された少なくとも

一つの領域および通常はRNase Hのための基質として機能する領域を含む。VHLをコードしている核酸に対するオリゴヌクレオチドの親和性は、オリゴヌクレオチドと標的が解離する温度であるオリゴヌクレオチド／標的対の T_m を測定することにより決定されるが、高い T_m は、標的に対するオリゴヌクレオチドの親和性を増加させる。より好適な実施態様では、VHL mRNA結合親和性を増加させるために修飾されたオリゴヌクレオチドの領域は、糖の2'位が修飾された2'-O-アルキルまたは2'-フルオロ修飾ヌクレオチド等を含む。上記した修飾オリゴヌクレオチドは、標的に対し、2'-デオキシオリゴヌクレオチドより高い標的結合親和性を有する。このように増加した親和性の効果は、VHL遺伝子発現のアンチセンスオリゴヌクレオチドによる阻害を増加させる。RNase Hは、RNA:DNAデュプレックスのRNA鎖を切断する細胞性エンドヌクレアーゼであり、この酵素の活性化によって、RNA標的は切断され、アンチセンス阻害がより効率的となる。別の好適な実施態様において、ヌクレアーゼ耐性を強化するためにキメラオリゴヌクレオチドも修飾される。細胞は、核酸を分解する種々のエキソ-およびエンド-ヌクレアーゼを含むので、多数の修飾ヌクレオチドおよびヌクレオシドを導入したオリゴヌクレオチドは、天然のオリゴヌクレオチドよりもヌクレアーゼ消化に対してより耐性となる。ヌクレアーゼ耐性は、オリゴヌクレオチドを細胞抽出物または単離ヌクレアーゼ溶液とともにインキュベートし、ゲル電気泳動により、残存するもとのオリゴヌクレオチドを定量することによって測定される。修飾されたオリゴヌクレオチドは、非修飾オリゴヌクレオチドよりも寿命が長くなる。好適なオリゴヌクレオチドは、少なくとも一つのホスホロチオエート修飾を含む。標的核酸との結合親和性を増強させたオリゴヌクレオチド修飾は、ヌクレアーゼ耐性を高めることができる。

本発明の好適なオリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、メチルホスホネート結合等を含む。最も好適オリゴヌクレオチドは、ホスホロチオエートおよび $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$ 等を含む。別の好適な実施態様においては、蛋白質-核酸またはペプチド-核酸（PNA）主鎖などのオリゴヌクレオチドのホスホジエステル主鎖がポリアミド主鎖によって置換されていてよい。他の好適なオリゴヌクレオチドは、OH、SH、 SCH_3 、F、OCN、 OCH_3OCH_3 、基などの一つを2'位に含んでいてもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの長さは、好ましくは、約8から約50ヌクレオチドである。本発明において、8から50ヌクレオチドの天然に存在しないオリゴマーを含んでいてもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、公知の固相合成法により合成できる。固相合成の装置は、例えば、Applied Biosystemsによって販売されている。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体を使用する別のオリゴヌクレオチド製造法を使用してもよい。

VHL mRNAの一部を標的とするある種のオリゴヌクレオチドがVHL発現の阻害に特に有用であることが見いだされた。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドの例として以下の配列番号3および4で表されるものが挙げられる。

5'-CGAGGTGCTCTTGGGTCAGC-3' (配列番号3)

5'-GAAAGGGCAGACTCGGTGGC-3' (配列番号4)

本発明の方法においては、組織または細胞をアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させる。本発明において、インピトロまたはエキスピボで細胞懸濁液または組織試料へアンチセンスオリゴヌクレオチドを加えるか、または動物内の細胞または組織にアンチセンスオリゴヌクレオチドを投与することにより組織または細胞を1または複数のアンチセンスオリゴヌクレオチドと接触させる。

本発明により、治療目的ために細胞を阻害する方法が提供される。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、医薬として使用可能な担体とともに、特定の疾患の性質、その重篤度および患者の全体の状態によって変化する用量および期間において、治療を必要とする患者に投与される。

本発明の医薬組成物は、局所、経口、または静脈内滴注、静脈注射、皮下、腹腔内もしくは筋肉内注射により、非経口で投与される。

局所投与のための製剤には、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、座剤、スプレー、水剤および散剤が含まれる。通常の医薬担体、水性、粉末または油性基剤、増粘剤などが使用される。

経口投与のための組成物には、散剤または顆粒剤、懸濁剤、水、非水溶剤、カプセル剤、錠剤が含まれる。増粘剤、芳香剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤または結合剤を使用してもよい。

非経口投与のための製剤としては、緩衝剤、希釈剤およびその他の適当な添加物を含んでいてもよい無菌水溶液等が挙げられる。

上記した医薬担体に加えて、アンチセンスオリゴヌクレオチドの取り込みが容易となるように、カチオン性液体を医薬製剤に加えても良い。

投与量は、処置される患者の状態の重篤度および応答の度合いによって変化する。処置は、治療の達成あるいは疾患状態の軽減の達成までの数日から数カ月続けられる。最適の投与計画は、体内の薬剤蓄積量から、最適投与量、投与方法および繰り返し頻度を決定できる。最適な投与量は個々のアンチセンスオリゴヌクレオチドの相対的有効性によって変化するが、一般的にはインビトロおよびインビボでの動物実験からの EC_{50} に基づいて計算できる。例えば、化合物の分子量および IC_{50} などの有効量から、 mg/kg での投与量が容易に計算される。

[実施例]

以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

[実施例 1]

遺伝子導入細胞が神経芽腫細胞 SH-SY5Y の場合、導入する VHL 遺伝子として用いた VHLcDNA (g7-11) は、以下の方法によって得た。まず、腎癌の手術時に得られた正常腎組織を、グアジニンイソチオネートを含んだフェノール又はフェノール/クロロホルム溶液でホモジナイズし、高速遠心により水層と有機層に分離した後、水層に含まれる全 RNA をイソプロパノールに加え沈殿させて回収した。次に、mRNA から逆転写酵素の存在下に cDNA を合成したのち、5'-CTGAATTCACCATGCCCCGAGGGCGGAG-3' (配列番号 1) および 5'-GAGAATTCTCAATCTCCCATCCGTTGATG-3' (配列番号 2) をプライマーのセットとして用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によりサーマルサイクラー (MJ Research 社) を用いて目的の領域を増幅し、DNA 精製用キット (Amicon 社) にて精製したのち、ネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれたプラスミド発現ベクター (pcDNA3.1, Invitrogen 社) へ組み込んだ。

VHL 遺伝子を組み込んだプラスミド発現ベクター pcDNA3.1 をネオマイシン

(Genecitin, GIBCO BRL 社) を、 $200 \mu\text{g/mL}$ の濃度になるようにした 10% 牛胎児血清を含む DMEM (GIBCO BRL 社) 培地で培養中の神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) へ遺伝子導入試薬 Effectene (QIAGEN 社) を用いて導入して、発現しているクローンのみを選別し、増殖させた。

VHL 遺伝子を導入する前の神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) は、10% 牛胎児血清を含む DMEM 培地で、炭酸ガス培養装置内で 37°C 、5% 二酸化炭素の条件でペトリ・ディッシュ 3003 (ファルコン社) にてディッシュ底に接着させて培養した。継代培養は、4 日毎に 1:6 に分割して行った。

VHL 遺伝子導入後の神経芽腫細胞 (SH-SY5Y) は、ネオマイシン (Genecitin, GIBCO BRL) を $200 \mu\text{g/mL}$ の濃度になるように調整した 10% 牛胎児血清を含む DMEM 培地で、炭酸ガス培養装置内で 37°C 、5% 二酸化炭素の条件でペトリ・ディッシュ 3003 (ファルコン社) にてディッシュ底に接着させて培養した。この細胞の継代培養は、6 日毎に 1:6 に分割して行った。

VHL 遺伝子を導入した神経芽腫細胞 SH-SY5Y (宿主細胞) における VHL 蛋白および神経特異蛋白の発現は、以下の方法によって調べた。すなわち、神経特異的蛋白として、NPY、NFH を蛍光免疫染色法にて調べた。この方法は、Kanno らの論文 (Kanno H, et al.: Cancer Res 60: 2820-2824, 2000) に記載された方法に準じて行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Bio-Rad 社) にて観察した。VHL 蛋白と神経特異的蛋白が同時に同じ細胞に発現していることが観察された。

VHL 遺伝子を導入した神経芽腫細胞 (宿主細胞) からの神経特異的蛋白の分泌は、別の Kanno らの論文 (Kanno H, et al: Cancer Gene Therapy 6 (2): 147-154, 1999) に記載された方法に準じて ELISA 法にて行った。宿主細胞においてはカリウムイオンによる細胞外電位刺激およびカルバコールによるコリン刺激により、NPY の開口放出が観察された。

VHL 遺伝子を導入した神経芽腫細胞 SH-SY5Y (宿主細胞) の形態は、位相差顕微鏡によって観察する。成熟した神経細胞へ分化している細胞には、細胞突起に瘤 (varicosity) が観察された。

神経電気生理学的所見は、以下の方法によって調べた。すなわち、パッチクランプ法により、微小針電極を細胞に刺して、細胞内電位を測定すると、神経細胞 (ニュー

ロン) にみられる大きなナトリウムチャンネル電流とカリウムチャンネル電流が測定された。

VHL 遺伝子導入神経芽腫細胞 SH-5YSY (宿主細胞) の移植は、以下の方法によって行った。すなわち、あらかじめ宿主細胞を十分に無血清の DMEM などの培地で洗浄したのちに、0.1mL の生理食塩水中に 10 万個以上の濃度で細胞を含むように調整し、大脳への移植するために、10 万個の細胞を、定位的脳手術装置を用いて大脳の線条体へ注入した。

[実施例 2]

遺伝子導入細胞が ES 細胞の場合、導入する VHL 遺伝子として用いた VHLcDNA (g7-11) は、以下の方法によって得た。まず、腎癌の手術時に得られた正常腎組織を、グアニジンイソチオシアネートを含んだフェノール又はフェノール/クロロホルム溶液でホモジナイズし、高速遠心により水層と有機層に分離した後、水層に含まれる全 RNA をイソプロパノールに加え沈殿させて回収した。次に、mRNA から逆転写酵素の存在下に cDNA を合成したのち、5'-CTGAATTCACCATGCCCCGAGGGCGGAG-3' (配列番号 1) および 5'-GAGAATTCTCAATCTCCCATCCGTTGATG-3' (配列番号 2) をプライマーのセットとして用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法によりサーマルサイクラー (MJ Research 社) を用いて目的の領域を増幅し、DNA 精製用キット (Amicon 社) にて精製したのち、ネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれたプラスミド発現ベクター (pcDNA3.1, Invitrogen 社) へ組み込んだ。

VHL 遺伝子を導入前の ES 細胞の培養は、Bain らの方法 (Bain G, et al: Developmental Biology 168: 342-357, 1995) に従って行った。

VHL 遺伝子を組み込んだプラスミド発現ベクター pcDNA3.1 を遺伝子導入試薬 Effectene (QIAGEN 社) を用いることにより、ネオマイシン (Genecitin, GIBCO BRL 社) を 200 µg/mL の濃度になるように調整した 10% 牛胎児血清を含む DMEM/F12 (GIBCO BRL 社) 培地に添加して導入して、発現しているクローンのみを選別し、増殖させた。

VHL 遺伝子を導入した ES 細胞 (宿主細胞) における VHL 蛋白および神経特異蛋白の発現は、神経特異的蛋白質として、MAPs を蛍光免疫染色法にて調べた。こ

の方法は、Kanno らの論文 (Kanno H, et al.: Cancer Res 60:2820-2824, 2000) に記載された方法に準じて行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Bio-Rad 社) にて観察した。VHL 蛋白と神経特異的蛋白が同時に同じ細胞に発現していることが観察された。

VHL 遺伝子を導入した E S 細胞 (宿主細胞) からの神経特異的蛋白の分泌は、別の Kanno らの論文 (Kanno H, et al.: Cancer Gene Therapy 6 (2): 147-154, 1999) に記載された方法に準じて ELISA 法にて行った。宿主細胞においてはカリウムイオンによる細胞外電位刺激およびカルバコールによるコリン刺激により、NPY の開口放出が観察された。

VHL 遺伝子を導入した E S 細胞 (宿主細胞) の形態は、位相差顕微鏡によって観察する。成熟した神経細胞へ分化している細胞には、細胞突起に瘤 (varicosity) が観察された。

神経電気生理学的所見は、以下の方法によって調べた。すなわち、パッチクランプ法により、微小針電極を細胞に刺して、細胞内電位を測定すると、神経細胞 (ニューロン) にみられる大きなナトリウムチャンネル電流とカリウムチャンネル電流が測定された。

VHL 遺伝子導入 E S 細胞 (宿主細胞) の移植は、以下の方法によって行った。すなわち、あらかじめ宿主細胞を十分に無血清の DMEM などの培地で洗浄したのちに、0.1 mL の生理食塩水中に 10 万個以上の濃度で細胞を含むように調整し、脊髄への移植するために、手術用顕微鏡 (Zeiss 社) を用いて 10 万個の細胞を胸椎の椎弓を切除した脊髄の硬膜内へ直接注入した。

産業上の利用可能性

本発明の VHL 遺伝子を導入、発現した神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞などのガン細胞および E S 細胞は、神経細胞へ分化するので、神経再生のために大量に神経細胞を提供することが可能となる。また、アンチセンス技術を用いることにより、神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞などのガン細胞および E S 細胞の分化を制御できる。さらに、VHL 遺伝子を導入、発現した神経芽腫細胞、神経系由来の未分化腫瘍細胞および E S 細胞を試験管内で培養、増殖後、中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着させ、神経細胞として機能させることにより、障害のある

神経機能に関連した神経難病（パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン舞踏病、アルツハイマー病、脳梗塞）および脊髄損傷、脳挫傷または悪性腫瘍疾患の治療が可能となる。またさらに、本発明で明らかにされたVHL遺伝子のメカニズムから、神経分化を誘導する新しい治療薬開発のための道が開かれた。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 - 4 : 合成 DNA

請 求 の 範 囲

1. ガン細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子を導入し、発現させることにより作成した宿主細胞。
2. ガン細胞が神経芽腫細胞である請求項1記載の宿主細胞。
3. ガン細胞が神経系由来の未分化腫瘍細胞である請求項1記載の宿主細胞。
4. 以下の性質を有する請求項1記載の宿主細胞。
 - (1) 神経細胞特異的タンパク質として神経ペプチドYおよび神経フィラメントを発現し、神経ペプチドYを細胞外へ分泌する。
 - (2) 神経細胞特有の瘤を持つ神経突起を出し、神経回路を形成できる。
 - (3) 神経細胞特有の膜電位を有する。
 - (4) 試験管内で培養、増殖後、中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着する。
5. 胚性幹細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子を導入し、発現させることにより作成した宿主細胞。
6. 以下の性質を有する請求項5記載の宿主細胞。
 - (1) 神経細胞特異的タンパク質として神経ペプチドY、神経フィラメントおよび微小管関連タンパク質2 (MAP 2) を発現する。
 - (2) 神経として電気信号を伝達し、神経回路を形成し得る、成熟した神経細胞である。
 - (3) 機能性を有する神経として活動電位を伝播し、神経回路を形成できる。
 - (4) 試験管内で培養、増殖後、中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着する。
7. 中枢神経系内あるいは末梢神経へ移植して生着させ、神経細胞として機能させる

ことにより、障害のある神経機能に関連した疾患の患者を治療するための請求項 1 または 5 記載の宿主細胞。

8. 疾患がパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン舞踏病、アルツハイマー病、脳梗塞、脊髄損傷、脳挫傷または悪性腫瘍である請求項 7 記載の神経芽腫細胞または胚性幹細胞。

9. ガン細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子を導入して、神経分化を誘導し神経細胞を得る方法。

9. ガン細胞が神経芽腫細胞である請求項 9 記載の方法。

10. ガン細胞が神経系由来の未分化腫瘍細胞である請求項 9 記載の方法。

11. 胚性幹細胞にフォン・ヒッペル・リンドー遺伝子を導入し、神経幹細胞を経て、神経分化を誘導し、神経細胞を得る方法。

12. ガン細胞または胚性幹細胞にアンチセンス RNA またはアンチセンス DNA を導入して、フォン・ヒッペル・リンドー遺伝子の発現を抑制し、神経幹細胞から神経細胞への分化を抑制する方法。

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Fretek Co.,Ltd.

<120> Host cells obtained by introducing VHL gene into cancer cells or embryonic stem cell

<130> PH-1081-PCT

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

<400>

ctgaattcac catgccccgg agggcggag 29

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

<400> 2

gagaattctc aatctcccat ccgttgatg 29

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

<400> 3

cgaggtgctc ttgggtcagc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

<400> 4

gaaagggcag actcgggtggc

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06668

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, 5/08, 5/10, A61K35/12, 35/30, 48/00, 31/711,
A61P25/16, 21/04, 25/14, 25/28, 9/10, 25/00, 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, 5/08, 5/10, A61K35/12, 35/30, 48/00, 31/711,
A61P25/16, 21/04, 25/14, 25/28, 9/10, 25/00, 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), DDBJ/EMBL/GenBank/GenSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cancer Research, Vol. 60, (June, 2000), Kanno, H., et al., "Role of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein during Neuronal Differentiation", pages 2820 to 2824	1-12
A	Science, Vol.260, (May, 1993), Latif, F., et al., "Identification of the von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene", page 1317 to 1320	1-12
A	Biochemical et Biophysica Acta, Vol.1242, No.3, (March, 1996), Gnarr, J. R., et al., "Molecular cloning of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and its role in renal carcinoma", pages 201 to 210	1-12
A	Cancer Detection and Prevention, Vol.18, No.2, (2000), Wakins, D., et al., "Genetics, Prognosis and Therapy of Central Nervous System Tumors", pages 139 to 144	1-12
A	Nature Medicine, Vol.5, No.12, (December, 1999), McDonald, J. W., et al. "Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord", pages 1410 to 1412	5-8, 11-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing
date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means
"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 October, 2000 (19.10.00)

Date of mailing of the international search report
31 October, 2000 (31.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N15/12, 5/08, 5/10, A61K35/12, 35/30, 48/00, 31/711, A61P25/16, 21/04, 25/14, 25/28, 9/10, 25/00, 35/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. C12N15/12, 5/08, 5/10, A61K35/12, 35/30, 48/00, 31/711, A61P25/16, 21/04, 25/14, 25/28, 9/10, 25/00, 35/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), DDBJ/EMBL/GenBank/GenSeq		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Cancer Research, Vol.60, (6月.2000), Kanno H., et al. "Role of the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein during Neuronal Differentiation", p.2820-2824	1-12
A	Science, Vol.260, (5月.1993), Latif F., et al. "Identification of the von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene", p.1317-1320	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 19.10.00		国際調査報告の発送日 31.10.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 北村 弘樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Biochemica et Biophysica Acta, Vol.1242, No.3, (3月.1996), Gnarr J. R., et al. "Molecular cloning of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and its role in renal carcinoma", p.201-210	1-12
A	Cancer Detection and Prevention, Vol.18, No.2, (2000), Watkins D., et al. "Genetics, Prognosis and Therapy of Central Nervous System Tumors", p.139-144	1-12
A	Nature Medicine, Vol.5, No.12, (12月.1999), McDonald J. W., et al. "Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord", p.1410-1412	5-8, 11-12